Rev. Acad. Canar. Cienc., VIII (Núms. 2, 3 y 4), 107 - 124 (1996)

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA MICROSOMAL CAPTADORA DEL ESTEROIDE ANABOLIZANTE ESTANOZOLOL EN MICROSOMAS HEPÁTICOS Y DE CÁNCER DE MAMA

[2]L.D. Boada, [2]L. Fernández, [2]M. Zumbado, [2]O.P. Luzardo, [1]R. Chirino y [1]B.N. Díaz Chico

Departamentos de Endocrinología Celular y Molecular[1] y Ciencias Clínicas II[2]. Centro de Ciencias de la Salud y Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apdo. de Correos 550, E-35080 Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias. España.

ABSTRACT

Male rat liver microsomes contain a [3H]Dexamethasone binding site, capable of binding glucocorticoids and progesterone. We have previously shown that the 17α-alkylated androgen stanozolol can inhibit the [3H]Dexamethasone binding to microsomes through a negative allosteric mechanism, which gives rise to the possibility of its interaction with a different binding site. In this study, the existence of a single-saturating binding site, capable of binding the radioactive steroid with a B_{max} of 49 ± 2 pmol/mg protein and a k_d of 37 ± 1.3 nM was demonstrated using [3H]Stanozolol. In competition experiments, only stanozolol and danazol were able to compete with [3H]Stanozolol for its binding to microsomes, among more than 120 steroids and other compounds tested. The binding of [3H]Stanozolol was depressed after protease treatment of microsomes, or after administration of cycloheximide to adult male rats for 24 h, which suggests its proteic nature. The [3H]Stanozolol binding site was detected in many tissues of the rat, with the highest concentrations being found in the liver. It was also found in quite variable concentration (range: 0.1 to 13 pmol/mg protein) in the microsomal fraction of human breast cancer specimens. It was detected from birth, increasing afterwards in concentration and reaching a peak at two-three months of age. This is the first experimental verification of the existence in liver microsomes of a specific binding site for some 17α-alkylated androgens, such as stanozolol and danazol, different from the Androgen Receptor or the [3H]Dexamethasone binding site. Its presence in breast cancer microsomes opens a new perspective for understanding steroid accumulation and transformation by tumor cells.

RESUMEN

La fracción microsomal del hígado de rata contiene varias proteínas que captan hormonas esteroideas. En trabajos previos estudiamos la captación de [3H]Dexametasona ([3H]DEX) por microsomas hepáticos "*in vitro*", y encontramos que dicho esteroide es deplazado por todos los glucocorticoides naturales, por la progesterona, y por algunos 17α-alquil-esteroides, como los estrógenos etinilestradiol y mestranol y los andrógenos estanozolol (ES) y danazol. Según experimentos previos el ES puede inhibir la unión de [3H]DEX a los microsomas "*in vitro*" mediante un mecanismo alostérico. Este dato sugería la posibilidad de que el ES se uniera en realidad a otra proteína microsomal.

distinta de la que capta [3H]DEX, pero capaz de interactuar con ella. En el presente trabajo, hemos utilizado [3H]ES para intentar demostrar que existe un lugar de unión microsomal específico para este andrógeno anabolizante. Hemos encontrado, por primera vez, que los microsomas hepáticos contienen un lugar de unión específico para el [3H]ES. La interacción entre ambos sigue una cinética de saturación correspondiente un lugar simple de unión, con una K_d de 37 ± 1.3 nM, y un número máximo de lugares de unión de 49 ± 2 pmol/mg de proteína. En experimentos de competición encontramos que solo el ES y el danazol, entre más de 120 compuestos estudiados, son capaces de competir con el [3H]ES por unirse a los microsomas hepáticos. Su naturaleza proteica quedó establecida por la desaparición de la capacidad de captación de [3H]ES que sufren los microsomas tratados con proteasas, y a pH extremos, asi como por la disminución de los mismos en animales tratados con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica. La proteína captadora de [3H]ES fué detectada en muchos tejidos de rata y humanos, hallándose su máxima concentración en hígado. Al contrario que los lugares de unión de [3H]DEX, la proteína captadora de [3H]ES existe en cantidades similares en hígados de ratas de ambos sexos, y también abunda desde el día del nacimiento. Estos datos sugieren que los lugares de unión para [3H]DEX y para [3H]ES residen en dos proteínas diferentes, aunque capaces de interactuar entre ellas. Dado que el ES ha sido utilizado en el tratamiento del cáncer de mama avanzado, también estudiamos la posible presencia de esta proteína en microsomas procedentes de muestras de cáncer de mama humano. Encontramos que éstos contienen concentraciones muy variables del lugar de unión para [3H]ES (rango: 0.1 a 13 pmol/mg de proteína), y por término medio más elevadas que las de los tejidos de rata, con la excepción del hígado. Este hallazgo abre nuevas perspectivas para comprender la acumulación y utilización de esteroides por parte de la célula tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos anabolizantes androgénicos 17α-alquil-derivados (17α-AAS) como el Estanozolol (ES) son conocidos generalmente por casos famosos de abuso en su ingestión por atletas de alta competición. El uso ilegal de estos compuestos está enormemente extendido entre deportistas no sujetos a un control anti-dopaje estricto, como en los deportes autóctonos y, especialmente, entre practicantes de culturismo (Wilson [37]; Lukas [22]). En clínica tienen un amplio uso en el tratamiento de varias enfermedades (Agostini *et al.* [1]; Sheffer *et al.* [34]; Daniel *et al.* [10]). Su mecanismo de acción se supone que es a través de su unión al receptor de andrógenos (RA), actuando como agonistas de los mismos e induciendo la acumulación de proteína muscular. También se ha demostrado que pueden actuar como antagonistas de los glucocorticoides, saturando el receptor de glucocorticoides (RG) e impidiendo la acción degradadante de proteínas de estos esteroides (Mayer y Rose [23]; Barbieri *et al.* [3]; Lukas [22]).

No obstante, existe una evidencia creciente de que los compuestos 17α-AAS pueden actuar a través de mecanismos no mediados por los receptores. En efecto, se han descrito numerosas diferencias entre los mecanismos de acción en hígado de la testosterona y sus derivados 17α-alquílicos. Al contrario que la testosterona o sus ésteres, los 17α-alquil-derivados causan aumentos de la concentración de varias proteínas plasmáticas que son sintetizadas en el hígado, como los factores de coagulación y el inhibidor del primer componente del complemento (Barbosa *et al.* [4]; Agostini *et al.* [1]; Sheffer *et al.* [34]; Gralnick y Rick [15]). Es obvio que estos efectos de los 17α-AAS no pueden ser mediados por el RA. La investigación de la interacción de los 17α-AAS con proteínas distintas del RA que captan específicamente estos esteroides puede ayudar a clarificar las razones de las diferentes respuestas hepáticas en comparación con los andrógenos naturales. Entre los candidatos a ser investigados están las proteínas microsomales hepáticas que captan hormonas esteroideas.

El hígado de rata contiene sitios de unión para [3H]Dexametasona ([3H]DEX), que están presentes tanto en la fracción microsomal (Mayeswi y Litwack [24]; Ambellan *et al.* [2]; Omrani *et al.* [28]; Quelle *et al.* [30]) como en la envuelta nuclear (Kaufmann y Sharper [17]; Howell *et al.* [16]; Roszak *et al.* [32]). Es capaz de interactuar con todos los glucocorticoides naturales y sintéticos,

progesterona (Chirino *et al.* [6]; Roszak *et al.* [32]), 17α-alquil-estrógenos (Fernández *et al.* [12]) y 17α-AAS (Fernández *et al.* [13]), con menor afinidad que la que exhiben estos compuestos por unirse a sus respectivos receptores (K_d para receptores de esteroides: 0.1 a 2 nM; K_d para lugares de captación de esteroides: 10-200 nM). Debido a esta menor afinidad nuestro grupo propuso para ellos el nombre de Low Affinity Glucocorticoid-binding Sites (LAGS, Chirino *et al.* [6]). No obstante, esta baja afinidad es compatible con que puedan alcanzar un estado de semisaturación a los niveles plasmáticos de estos compuestos cuando son naturales, o a las dosis a las que son habitualmente administrados a los pacientes, y completamente saturados en casos de abuso de estas drogas.

Los lugares de unión para [3H]DEX están bajo regulación endocrina mediante un complejo sistema de interacciones hormonales, con participación decisiva de glucocorticoides y hormonas tiroideas (Chirino *et al.* [7]) y hormona de crecimiento (Chirino *et al.* [9]). Nuestro grupo también pudo demostrar que los lugares de unión para [3H]DEX son inducidos por dosis farmacológicas de estradiol aplicadas a ratas machos o hembras (Chirino *et al.* [8]) y por los 17α-alquil-estrógenos (Fernández *et al.* [12]), siendo fuertemente disminuidos por la administración de 17α-AAS (Fernández *et al.* [13]) y por la implantación de una cápsula que libere lentamente estradiol hasta alcanzar niveles fisiológicos (López-Guerra *et al.* [20]). Su localización celular, su ontogenia (Chirino *et al.* [7]), su regulación endocrina y el hecho de que anticuerpos monoclonales contra el RG o contra la Globulina Captadora de Corticosteroides (CBG) no reaccionen con los lugares de unión para [3H]DEX (Howell *et al.* [16]; Lacasse *et al.* [18]) prueban que éstos residen en de proteínas diferentes del RG o la CBG.

En un estudio previo (Fernández *et al.* [13]) pudimos demostrar que varios 17α-AAS son capaces de interactuar con los lugares de unión para [3H]DEX. Los análisis de captación y de disociación de [3H]DEX en presencia de ES revelaron que este esteroide causa una inhibición irreversible de la unión de [3H]DEX a los microsomas a través de un mecanismo alostérico. Esta propiedad la tienen también otros compuestos relacionados con el ES, como el danazol. Por otra parte, la administración de ES a ratas provoca una fuerte caída de LAGS, cuya recuperación requiere de síntesis de nueva proteína. Estos datos sugirieron que los 17α-AAS pudieran tener un lugar de unión diferente de los LAGS, pero capaz de interactuar con ellos, y nos condujo a llevar a cabo el estudio de tal posibilidad mediante el uso de [3H]Estanozolol ([3H]ES). Los resultados de dicho estudio (Boada *et al.* [5]) nos han permitido demostrar que existe una proteína microsomal capaz de unirse al [3H]ES diferente de los lugares de unión para [3H]DEX y del RA.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El [3H]ES (6 Ci/mmol) fué sintetizado por encargo en The Radiochemical Centre (Amersham, Reino Unido); la [3H]Dexametasona (45 Ci/mmol), el R1881 (metiltrienolona), el R5020 (promegestona) y la mibolerona fueron adquiridos a New England Nuclear (Boston, EEUU). El resto de los productos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Química España (Alcobendas, Madrid).

Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 2 a 3 meses de edad fueron utilizados en los diferentes experimentos. Fueron adquiridos a Charles River Inc. (St. Aubin les Elbeuf, Francia) y mantenidos en el animalario del Centro hasta su utilización. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las guías institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

El día de la experimentación los animales fueron sacrificados por decapitación y sus hígados extraídos rápidamente y homogenizados en un homogenizador Potter (B.Braun, Melsungen, Alemania) de teflón-vidrio en tampón TMMDS a 0°C (Fernández *et al.* [13]) Los homogenados fueron centrifugados a 17.000 x g durante 15 min a 0°C para separar las fracciones nuclear y microsomal. El sobrenadante fué centrifugado a 105.000 x g durante 1 h a 0°C y los precipitados (fracción microsomal) resuspendidos en TMMDS y centrifugados de nuevo a 105.000 x g. El precipitado final fué resuspendido en TMMDS para dar una concentración proteíca de 2-3 mg/ml (Lowry *et al.* [21]). Esta concentración fué seleccionada porque en experimentos previos se había demostrado que es óptima para estudios de captación de esteroides.

2.1. Especímenes tumorales

Los especímenes tumorales fueron obtenidos del Hospital Materno-Infantil (Las Palmas de Gran Canaria, España), y mantenidos a -70°C hasta su utilización. Las fracciones tisulares analizadas fueron obtenidas mediante el procedimiento descrito previamente (Valerón *et al.* [36], [37]).

2.2. Análisis de captación de radioligandos

Alícuotas de suspensiones microsomales (200 μl) fueron incubadas a diversos tiempos y temperaturas, como se señala en los pies de figura, con concentraciones crecientes de [3H]ES (5 a 500 nM), en un volúmen final de 500 μl. La captación específica de [3H]ES se define como la diferencia entre la captación en presencia de un exceso de 200 veces de ES no marcado (captación inespecífica) y la captación sin competidor no marcado (captación total). Al final del proceso de incubación se añadió una suspensión (400 μl) de dextrano (0.08%) y carbón activo (0.8%) en tampón TMMDS, y los tubos agitados vigorosamente, incubados 10 min. y centrifugados. Una alícuota de 400 μl del sobrenadante fué utilizada para contar su radiactividad.

2.3. Análisis de los datos de captación de [3H]Estanozolol

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante los programas informáticos KINETIC, EBDA y LIGAND PC (McPherson [25]) y GraphPad INPLOT (GraphPad Software, San Diego, EEUU) de ajuste de curvas. Las diferencias estadísticas entre los diversos grupos experimentales estudiados fueron establecidas mediante el test t de Student. Se estableció como diferencia significativa cuando la $p<0.05$. Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (E.E.M.).

Los experimentos de saturación con [3H]ES de las suspensiones microsomales fueron llevados a cabo mediante incubación con concentraciones crecientes del ligando radiactivo (5-500 nM). Como muestra la Figura 1, la captación específica de [3H]ES es un proceso saturable, mientras que la captación inespecífica aumenta linealmente con la concentración de ligando radiactivo. La representación de la ecuación de Scatchard (inserta) de los datos de captación fué rectilínea en el rango de [3H]ES de 20 a 500 nM. A concentraciones inferiores (5 a 10 nM) los puntos obtenidos mostraron una tendencia progresiva a separarse de la línea recta. El número máximo aparente de lugares de unión específicos de [3H]ES fué de 49 ± 2 pmol/mg proteína, y la K_d fué de 37 ± 1.3 nM.

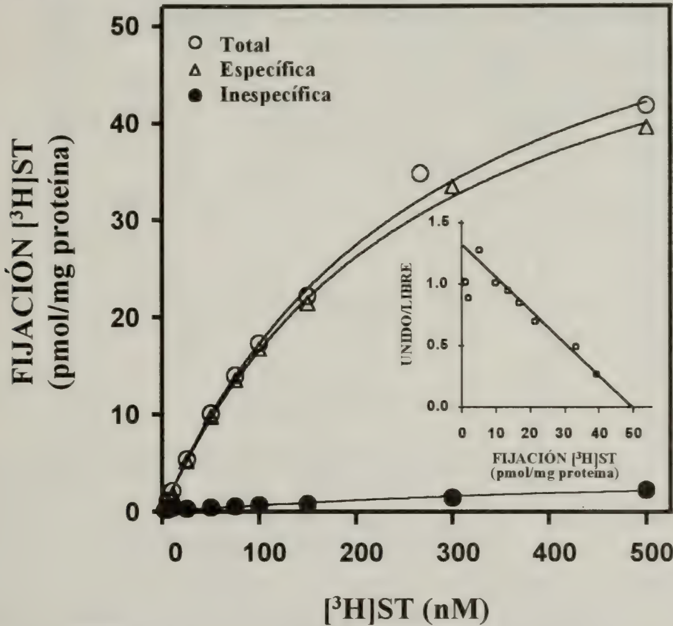


Figura 1. Análisis de saturación de la captación [3H]Estanozolol a microsomas de hígado de rata. Las suspensiones microsomales fueron incubadas 18 h a 0°C en concentraciones crecientes de [3H]ES (entre 5 y 500 nM, concentración final), en ausencia (Total) o en presencia (Inespecífica) de 200 veces de exceso de ES no marcado. El ES no unido a microsomas fué separado por tratamiento de la muestra con Dextrano-Carbón activo. La figura muestra un experimento representativo de curva de saturación, y, en el inserto, una representación de Scatchard de la captación específica de [3H]ES.

La cinética de asociación de [3H]ES fué llevada a cabo incubando los microsomas hepáticos con este compuesto a una concentración final de 500 nM, a 0°C a tiempos variables. Como muestra la Figura 2, la interacción del [3H]ES con los microsomas hepáticos fue muy rápida, con una saturación del 66% al cabo de 20 minutos. La máxima saturación se alcanza a las 8 horas, y permanece estable durante 24 horas, al menos. Cuando las incubaciones se llevaron a cabo a 25°C la captación permaneció estable al menos 24 horas, pero a 37°C la capacidad de los microsomas decrece a partir de las 8 horas. A las tres temperaturas estudiadas, la captación de [3H]ES se ajusta mejor a un modelo biexponencial, y se puede resolver en dos componentes, uno rápido y otro lento.

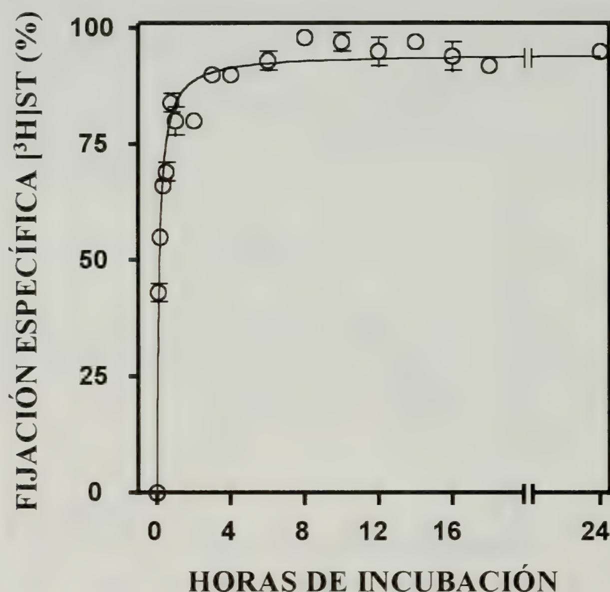


Figura 2. Cinética de asociación de [3H]Estanozolol a microsomas hepáticos de rata macho. Las suspensiones microsomales fueron incubadas con [3H]ES (500 nM, concentracion final) a 0°C. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas por duplicado, que fueron tratadas con Dextrano-Carbón activo, y se contó la radiactividad unida a microsomas. La captación inespecífica se determinó llevando a cabo experimentos en paralelo en presencia de un exceso de 200 veces de ES no radiactivo en la mezcla de incubación. Los datos representan el porcentaje relativo al máximo de captación, que se obtuvo al cabo de 18 h de incubación a 0°C. Cada punto representa la media ± E.E.M. de tres experimentos realizados por separado.

La cinética de disociación de [3H]ES de los microsomas hepáticos a 0°C fué como se muestra en la Figura 3. La captación de [3H]ES es reversible, y se ajusta mejor a un modelo biexponencial, de un componente rápido y otro lento. La disociación a 25°C fué más rápida que a 0°C.

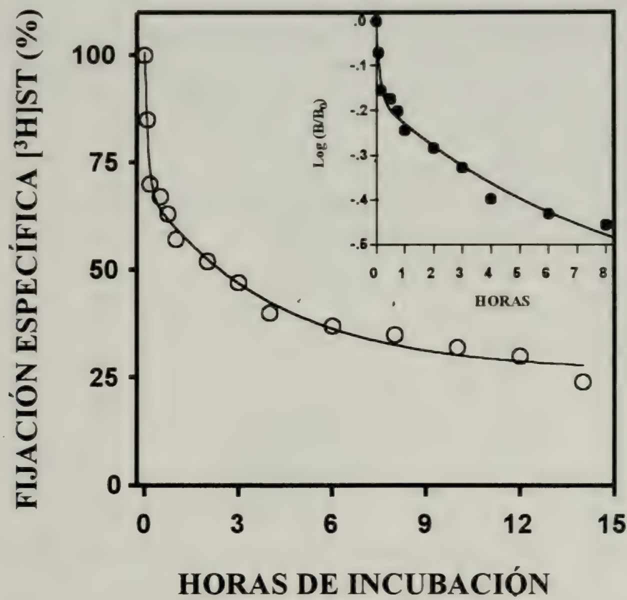


Figura 3. Cinética de disociación del [3H]Estanozolol de su lugar de unión a microsomas hepáticos de rata macho. Las supensiones de microsomas fueron equilibradas 8 h a 0°C con 500 nM de [3H]ES. La curva de disociación fué iniciada después de la adición de ES no marcado para dar una concentración final de 200 μM. La incubación fué continuada a 0°C, y fué detenida medianteDextrano-Carbón activo a la mezcla de incubación a los tiempos especificados. La captación inespecífica fué determinada por experimentos en paralelo con un exceso 200 veces de ES no marcado. Cada punto representa la media ± E.E.M. de seis experimentos realizados por separado, y representan el porcentaje de captación específica al tiempo 0. La figura insertada representa el logaritmo de la relación B/B_0, siendo B la captación específica en cada momento, y B_0 la captación a tiempo 0.

Para determinar el efecto del pH sobre la captación de [3H]ES, los microsomas fueron resuspendidos en el buffer apropiado, y ajustado el pH en un rango de 5 a 11. Entonces se añadió el [3H]ES y la incubación se prolongó toda la noche a 0°C. Como se muestra en la Figura 4, la captación de [3H]ES es dependiente del pH de incubación, con un máximo de captación comprendido en el rango de 7.5 a 11 a 0°C.

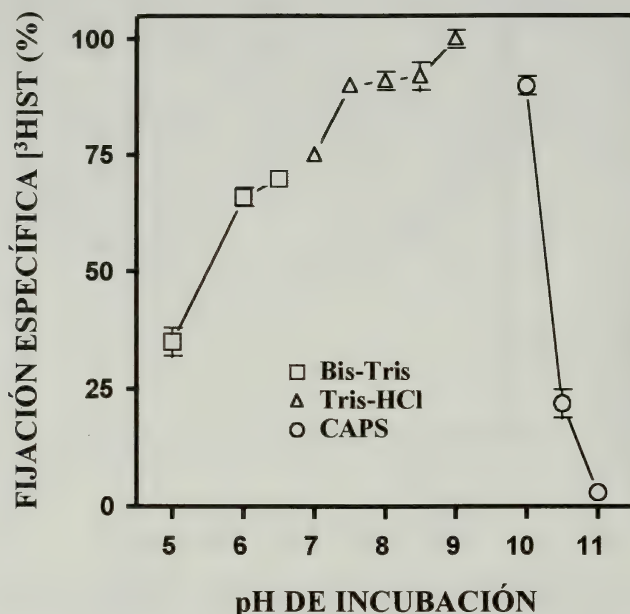


Figura 4. Efecto del pH de la incubación sobre la captación de [3H]Estanozolol. Los microsomas fueron resuspendidos en el tampón apropiado, previamente ajustado a los pH indicados a 0°C. Los microsomas fueron entonces centrifugados de nuevo, y vueltos a resuspender en los mismos tampones: Bis-Tris (pH 5-6.5), Tris-HCl (pH 7-9), y CAPS (pH 10-11). Todos los tampones fueron preparados a 50 nM, y contenían cloruro magnésico, molibdato sódico, ditiotritol y sacarosa, como se indica en Material y Métodos. Alícuotas de 280 μl de suspensiones microsomales fueron mezcladas con 20 μl de una solución de [3H]ES (preparado de una solución madre en 90 % H_2O, 10% Etanol), hasta una concentración final 500 nM. La incubación fué llevada a cabo a 0°C toda la noche, y fué detenida mediante Dextrano-Carbón activo, preparado en el correspondiente tampón. Cada punto representa la media ± E.E.M. de seis experimentos realizados por separado, y es expresada como porcentaje respecto del máximo de captación.

Con objeto de encontrar qué esteroide proporciona una interacción óptima con el lugar de unión para [3H]ES se llevaron a cabo curvas de dosis-respuesta añadiendo concentraciones crecientes (0-50 μM) de diversos compuestos a la mezcla de reacción. Con los datos obtenidos se calculó el valor del IC_{50} de cada compuesto. Como se muestra en la Figura 5, ES y danazol, entre más de 100 compuestos estudiados, fueron los únicos que mostraron capacidad de competir con el [3H]ES por unirse a los microsomas. El danazol mostró menos afinidad que el ES por su unión a los microsomas (IC_{50} = 9.81 ± 0.9 μM y 0.51 ± 0.1 μM, respectivamente). Una muestra del resto de los productos estudiados, que fueron incapaces de competir con el [3H]ES, se muestra en la Tabla 1.

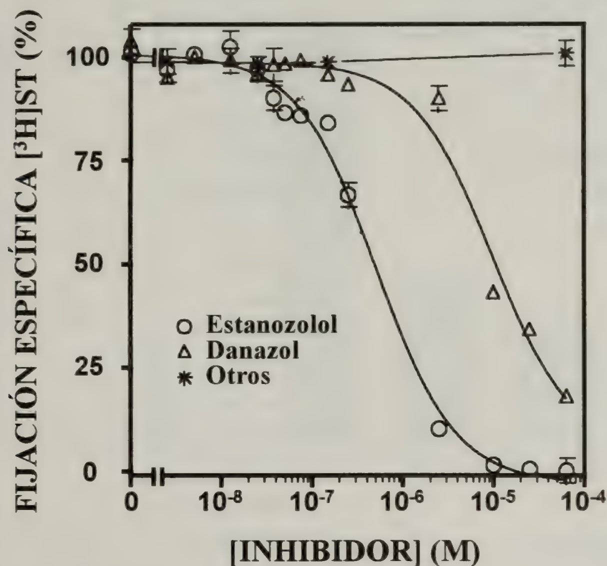


Figura 5. Inhibición de la captación específica de [3H]Estanozolol a microsomas por el Estanozolol y el Danazol. Las suspensiones microsomales fueron incubadas toda la noche a 0°C con [3H]ES (50 nM, concentracion final), en presencia de concentraciones crecientes (desde 10 nM a 50 μM) de ES o danazol no marcados, o de los otros productos reseñados en la Tabla 1. Las muestras fueron tratadas con Dextrano-Carbón activo y contadas para medir su radiactividad. Cada curva representa la media ± E.E.M. de cuatro experimentos separados, y se representa como porcentaje respecto del máximo de captación específica.

TABLA I. **Compuestos incapaces de competir con el [3H]Estanozolol por su lugar de unión a microsomas**

Andrógenos y Antiandrógenos	**Esteroides sulfatados**
Bolasterona	Dehidroisoandrosterona sulfato
Ciproterona	Epiandrosterona sulfato
Ciproterona acetato	Estradiol sulfato
5α-Dihidrotestosterona	Estriol sulfato
Etisterona	Estrona sulfato
Fluoximesterona	**Progestágenos y Antiprogestágenos**
Flutamida	Levonorgestrel
Mestanolona	Noretindrona
Metandriol dipropionato	Noretinodrel
Metandrostenolona	Progesterona
17α-Metiltestosterona	R5020
Mibolerona	RU486
Nandrolona	**Otros**
Oximetolona	Aldosterona
R1881	2-Aminobenzotiazol
Testosterona	Aminoglutetimida
Glucocorticoides	Anilina hidrocloruro
Corticosterona	Colesterol
Dexametasona	Cloramfenicol
Dexametasona-21-mesilato	Cimetidina
Hidrocortisona	Clotrimazol
Prednisolona	Haloperidol
Triamcinolona	Imidazol
Triamcinolona acetónido	Lindano
Estrógenos y Antiestrógenos	Metirapona
Dietilestilbestrol	α-Naftoflavona
17α-Estradiol	β-Naftoflavona
17β-Estradiol	Pregnenolona-16α-carbonitrilo
Estriol	SKF-525A
Estrona	Espironolactona
Etinilestradiol	Sulfobromoftaleina
Mestranol	Troleandromicina
Tamoxifeno	Triptamina hidrocloruro
4-OH-Tamoxifeno	Verapamil
	Vincristina

Para definir más claramente la naturaleza del lugar de unión para [3H]ES se llevaron a cabo dos experimentos. En uno de ellos se estudió su sensibilidad a los enzimas proteolíticos, incubando suspensiones microsomales hepáticas con proteinasa K y/o tripsina, durante 2 horas a 37°C antes del análisis de la capacidad remanente de captación de [3H]ES. Este tratamiento disminuyó drásticamente la captación de [3H]ES por los microsomas hepáticos, siendo la tripsina más efectiva que la proteinasa K (Figura 6).

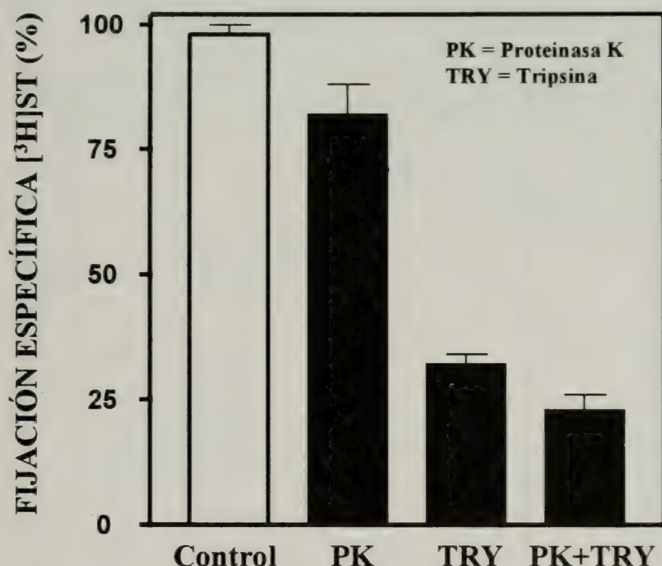


Figura 6. Efecto del tratamiento de los microsomas con proteasas sobre la captación de [3H]Estanozolol. Las suspensiones microsomales hepáticas fueron preincubadas 2 h a 37°C con proteinasa K (PK), tripsina (TRY) o ambos (PK+TRY). La concentración de cada enzima fué de 1 mg/ml en el medio de incubación. Después las muestras fueron llevadas hasta 2 mM con Fenilmetisulfonilfluoruro (PMSF) y centrifugadas a 105.000 x g durante 1 h a 0°C. Los precipitados se resupendieron en tampón TMMDS, y las muestras fueron incubadas toda la noche a 0°C con [3H]ES (500 nM, concentración final). La captación inespecífica fué calculada mediante incubaciones paralelas en un exceso de 200 veces de ES no radiactivo. Las muestras fueron finalmente tratadas con Dextrano-carbón activo, y contada la radiactividad. Los resultados se expresan como el porcentaje de captación específica de [3H]ES con respecto a las muestras de control, que recibieron el mismo tratamiento, excepto en lo referido a la adición de enzima. Los datos reflejan la media ± E.E.M. de tres experimentos independientes.

En otro experimento se estudió la dependencia de la síntesis proteica de la actividad del lugar de unión de [3H]ES. Para ello se inyectaron ratas macho adultas con el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida (CHX, 2 mg/kg) cada 8 horas, durante 24 horas. Los animales fueron sacrificados cada dos horas. La Figura 7 muestra que la CHX causa una reducción máxima del 40% en la capacidad microsomal de captar [3H]ES a las 24 horas. En este mismo experimento se midió el efecto de la CHX sobre la captación de [3H]DEX, siendo ésta máxima al cabo de 6 horas (85% de supresión) y permaneciendo así hasta las 24 horas. Estos datos, en conjunto, demuestran que tanto el lugar de unión para [3H]ES como el de [3H]DEX son de naturaleza proteica.

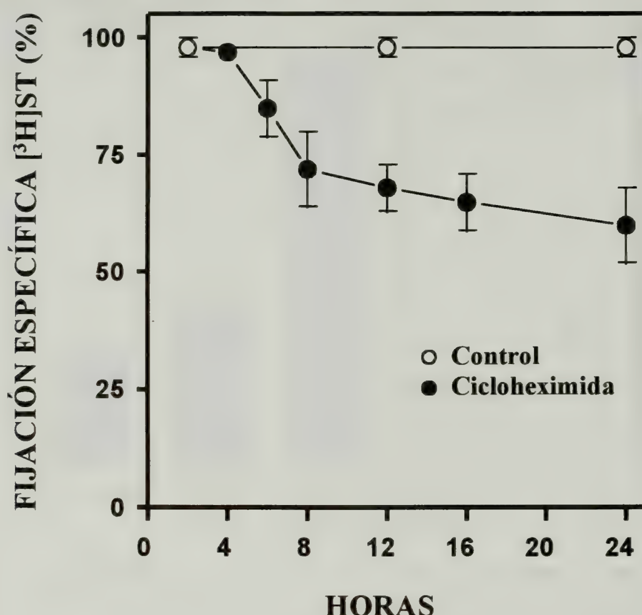


Figura 7. Efecto de la Cicloheximida (CHX) sobre el lugar de unión de [3H]Estanozolol. Ratas macho adultas fueron inyectadas intraperitonealmente con CHX a una dosis de 2 mg/kg p.v. cada 8 h. Los controles recibieron solución salina. Los animales fueron sacrificados 2-24 h después, y se determinó la concentración del lugar de unión para [3H]ES como se ha descrito. Cada punto representa la media ± E.E.M. de seis experimentos independientes.

La ontogenia del lugar de unión para [3H]ES fué estudiada en hígados de animales de diferentes edades. La Figura 8 muestra que los lugares de unión para [3H]ES son relativamente abundantes desde el nacimiento, y aumentan posteriormente para alcanzar su máxima concentración a los dos meses de edad.

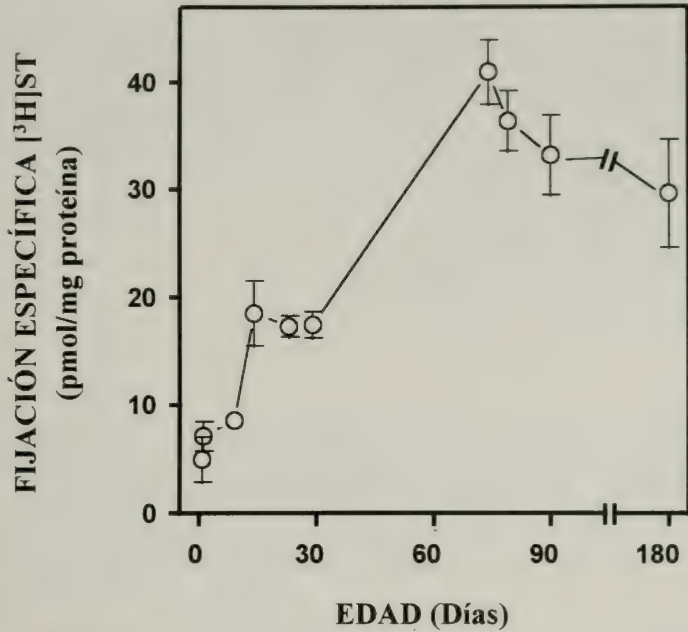


Figura 8. Ontogenia del lugar de unión de [3H]Estanozolol. Las suspensiones microsomales hepáticas fueron obtenidas a partir de ratas macho de las diferentes edades especificadas. La concentración del lugar de unión de [3H]ES fué determinada mediante incubación toda la noche a 0°C con una concentración saturante de [3H]ES (500 nM, concentración final). La captación inespecífica se calculó mediante incubaciones en paralelo con un exceso de 200 veces de Estanozolol no radiactivo. Cada punto representa la media ± E.E.M. de al menos cinco experimentos por separado.

La abundancia tisular de lugares de unión de [3H]ES fué estudiada en diversos tejidos de rata macho. La Tabla 2 muestra que todos los tejidos estudiados tienen cantidades detectables de lugares de unión para [3H]ES, siendo el hígado el que contiene una mayor abundancia y el corazón el que mostró una menor concentración.

TABLA II. **Abundancia del lugar de unión de [3H]Estanozolol en microsomas de diferentes tejidos de rata**

Tejido	*Captación de [3H]Estanozolol (pmol/mg proteína)*
Hígado	40.2 ± 6.00
Riñón	1.12 ± 0.27
Bazo	0.87 ± 0.59
Pulmón	0.52 ± 0.07
Esófago	0.42 ± 0.13
Colon	0.46 ± 0.09
Músculo esquelético	0.40 ± 0.22
Cerebro	0.40 ± 0.11
Próstata	0.36 ± 0.03
Intestino delgado	0.31 ± 0.04
Testículo	0.16 ± 0.03
Suero	0.04 ± 0.02
Corazón	0.02 ± 0.02

Los microsomas obtenidos de diferentes órganos y tejidos de cinco animales y sus correspondientes sueros sanguíneos fueron diluidos en tampón TMMDS e incubados toda la noche a 0°C con una única concentración saturante de [3H]Estanozolol (500 nM, concentración final). La radiactividad no unida a proteínas fué eliminada mediante tratamiento con Dextrano-Carbón activo. Los resultados se expresan mediante la media ± E.E.M.

Finalmente, la abundancia de lugares de unión para [3H]ES fué estudiada en la fracción microsomal de una serie de 70 especímenes de cáncer de mama humano. El rango de concentraciones obtenido osciló entre 0.087 y 13.7 pmol/mg proteína. La distribución de concentraciones (Tabla 3) refleja que la mayoría de los tumores estuvieron entre 1 y 3 pmol/mg proteína.

TABLA III. **Captación de [3H]Estanozolol por microsomas de cáncer de mama humano**

Intervalo de nivel de captación de [3H]ES (pmol/mg proteina)	*N° de casos*
< 1	12
1-2	25
2-3	14
3-5	9
5-10	6
> 10	4

Las suspensiones microsomales de los especímenes de cáncer de mama humano fueron obtenidas como se describe en Material y Métodos, resuspendidas en tampón TMMDS e incubados toda la noche a 0°C con una única concentración saturante de [3H]Estanozolol (500 nM, concentración final). La radiactividad no unida a proteínas fué eliminada mediante tratamiento con Dextrano-Carbón activo. Los resultados se expresan la distribución de las concentraciones en los 70 especímenes analizados en los intervalos de concentración que se especifican.

4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo demuestran por primera vez la existencia de lugares de unión específicos para [3H]ES en microsomas de hígado de rata y de cáncer de mama humano. Este lugar de unión muestra alta especificidad por el ES y el danazol, compuestos relacionados estructuralmente, entre más de 120 productos estudiados, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 1. Esta lista comprende una larga serie de esteroides naturales y sintéticos, con diversa actividad biológica. Varios hechos, como la saturabilidad de las membranas con [3H]ES, su sensibilidad al pH, a las proteasas y a la CHX y las variaciones que experimenta a lo largo de la vida, indican claramente que no se trata de una mera interacción del [3H]ES con la matriz lipídica de las membranas, sino que se trata de un verdadero lugar de unión proteico.

Diversas evidencias señalan que el lugar de unión para [3H]ES no está relacionado con el RA. Este se encuentra mayoritariamente en la fracción citosólica después del fraccionamiento tisular (Roy *et al.* [33]; Eisenfeld y Aten [11]), lo que contrasta abiertamente con la presencia del lugar de unión de [3H]ES en los microsomas. Además la concentración de éste es de tres órdenes de magnitud superior a la del RA. Finalmente, andrógenos como la testosterona, dihidrotestosterona, o R1881 (Metiltrienolona) que se unen fuertemente al receptor, carecen de afinidad por el lugar de unión para [3H]ES (Roy *et al.* [33]; Barbieri *et al.* [3]; Eisenfeld y Aten [11]; Steinsapir *et al.* [35]). Estos hechos nos permiten descartar la posibilidad de que el lugar de unión para [3H]ES sea una forma microsomal del RA.

El análisis de Scatchard de la unión de [3H]ES a microsomas hepáticos mostró una línea recta en el rango de concentraciones de 20 a 500 nM, lo que indica que se trata de un tipo único de lugares de unión. No obstante, a concentraciones de [3H]ES inferiores a 20 nM los puntos tienden a desviarse de forma creciente de la línea recta. Estos resultados abren la posibilidad de que se trate de un

cooperativismo positivo en la interacción de [3H]ES con los microsomas (Neet [26]; Notides *et al.* [27]), según el cual el lugar de unión aumenta su afinidad por el [3H]ES conforme se va saturando. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la cinética de disociación del [3H]ES desde los micosomas sigue un patrón bifásico. Obviamente, más experimentos son necesario para confirmar esta hipótesis, para lo cual se requiere sintetizar un [3H]ES con mayor actividad específica que los 6 Ci/mmol de la muestra aquí utilizada.

Nuestro laboratorio y otros grupos hemos descrito lugares de unión microsomales, distintos de sus respectivos receptores, para [3H]DEX, [3H]Etinilestradiol (Fernández *et al.* [12]) y [3H]Progesterona (Yamada *et al.* [39], [40]). El hecho de que los dos primeros muestren similar perfil farmacológico (Chirino *et al.* [6]; Fernández *et al.* [12], [13]) sugiere que se trata de la misma entidad. Por otra parte la progesterona desplaza la [3H]DEX de su lugar de unión y viceversa (Chirino *et al.* [6]), mientras que el antipsicótico haloperidol desplaza a la [3H]Progesterona pero no a la [3H]DEX. Esta última propiedad ha permitido sugerir a Yamada *et al.* ([40]) y Ramamoorthy *et al.* ([31]) que el lugar de unión para la [3H]Progesterona puede ser el receptor tipo sigma para el haloperidol, y sugieren que pueden ser diferente del de [3H]DEX. Sin embargo, toda la evidencia experimental disponible, pero especialmente los datos relativos al perfil farmacológico y la ontogenia, señala claramente que el lugar de unión para [3H]ES es diferente de los lugares de unión para [3H]DEX, [3H]Etinilestradiol o [3H]Progesterona.

El hecho de que el ES interactúe con el lugar de unión para [3H]DEX siguiendo un mecanismo alostérico (Fernández *et al.* [13]) presenta el problema teórico de si este efecto es ejercido directamente sobre el lugrar de unión para [3H]DEX, o si el ES actúa sobre su propio lugar de unión, que sería capaz de modular la actividad del de [3H]DEX. Diversos datos apuntan hacia la verosimilitud de la segunda hipótesis: 1) La cinética de disociación del [3H]ES de su lugar de unión a los microsomas es bifásica, sugiriendo una interacción compleja entre ligando y lugar de unión; en contraste, la unión de [3H]DEX a su lugar de unión es simple y su disociación monofásica (Fernández *et al.* [13]); 2) La concentración del lugar de unión para [3H]ES es considerablemente más alta que la del de [3H]DEX (Chirino *et al.* [6]; Fernández *et al.* [12], [13]); 3) La unión de [3H]ES a microsomas no es inhibida por DEX, ni por los más de 120 productos estudiados, esteroideos o de otras familias químicas, siendo altamente específico para danazol y ES; en contraste, el lugar de unión para [3H]DEX presenta un perfil farmacológico muy amplio, con capacidad de unión para esteroides con diversas estructuras y actividades biológicas (Chirino *et al.* [6]; Fernández *et al.* [12], [13]); 4) El lugar de unión para el [3H]ES está presente en hígado de rata desde el nacimiento, mientras que el de [3H]DEX es indetectable hasta la cuarta semana de vida (Parchman *et al.* [29]; Chirino *et al.* [6]); 5) El lugar de unión para el [3H]ES es igualmente abundante en hígado de rata hembra que de macho, mientras que el de [3H]DEX es indetectable hasta la cuarta semana de vida (Parchman *et al.* [29]; Chirino *et al.* [6], López-Guerra *et al.* [20]); 6) La administración de CHX provocó un efecto máximo del 40% de reducción en la capacidad microsomal de captar [3H]ES a las 24 horas, siendo su efecto del 85% de reducción en la captación de [3H]DEX a las 6 horas (Fernández *et al.* [15]); y, 7) La administración de ES a ratas provocó una reducción de la captación de [3H]DEX del 60% a las 2 horas, mientras que el nivel de captación de [3H]ES permaneció intacto (Boada *et al.* [5]). Todos estos datos nos permiten concluir que el lugar de captación microsomal de [3H]ES reside en una molécula diferente que el de [3H]DEX, y que la primera es capaz de modular alostéricamente la función de la segunda.

Es interesante destacar que la proteína captadora de [3H]ES no parece ser una proteína de secreción o una contaminación de la fracción microsomal con proteínas séricas, puesto que su concentración en suero es muy baja. Tampoco parece que se trate de una proteína implicada en la transformación de esteroides, P450 o sulfotransferasas, puesto que ninguno de los compuestos estudiados que tiene capacidad de inhibir los enzimas P450 o los esteroides sulfatados tienen capacidad de interactuar con la proteína captadora de [3H]ES. No obstante, para poder establecer el mecanimo de acción y la función fisiológica de esta proteína se hacen necesarios nuevos estudios.

El ES ha sido utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de mama avanzado. En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos estudiado la proteína $p185^{HER\text{-}2/neu}$, que se encuentra

en microsomas de cáncer de mama (Valerón *et al.* [36], [37]). La disponibilidad de tales muestras nos permitió estudiar la abundancia de la proteína captadora de [3H]ES en microsomas de cáncer de mama humano. Los resultados obtenidos muestran que se encuentra en concentraciones muy variables. Su abundancia media en cáncer de mama la coloca inmediatamente detrás del hígado de rata, y por encima de cualquier otro órgano de dicho animal. Esta sorprendente abundancia es indicativa de que puede ser una proteína interesante desde el punto de vista oncológico, y que puede contribuir a esclarecer su función intracelular.

En resúmen, hemos encontrado por primera vez evidencia de la existencia de un lugar microsomal de captación de algunos anabolizantes androgénicos con sustituyentes 17α-alquílicos, como el estanozolol y el danazol, que difiere del receptor de andrógenos y de los lugares de captación microsomal para otros esteroides, como [3H]DEX, [3H]Progesterona o [3H]Etinilestradiol. Este descubrimiento puede arrojar nueva luz sobre los mecanismos de acción del estanozolol y del danazol, dos compuestos ampliamente utilizados en clínica. Además, la presencia de la proteína captadora de [3H]ES en microsomas de cáncer de mama humano abre nuevas perspectivas para el estudio de la capacidad de estas células de capturar y transformar esteroides que pueden condicionar su propio desarrollo.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren dejar muestras de gratitud a D. Antonio Lleó por su ayuda en el manejo de los animales; y a D. Juan Rivero y Dª Pilar D.Viera por su ayuda técnica. Este trabajo ha sido financiado a través de proyectos de investigación concedidos por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad Autónoma de Canarias a los Dres. Ricardo Chirino, Leandro Fernández y Bonifacio N. Díaz Chico. Luis D. Boada y Leandro Fernández han contribuido igualmente al desarrollo de este trabajo, por lo que ambos deben ser considerados indistintamente como primer autor.

6. BIBLIOGRAFÍA

[1] AGOSTINI, A., CICARDI, M., MARTIGNONI, G.C., BERGAMASCHINI, L. and MARASINI, B. (1980) *J. Allergy Clin. Immunol.* 65: 75-79.
[2] AMBELLAN, E., SWANSON, M. and DAVIDSON, A. (1981) *J. Steroid Biochem.* 14: 421-428.
[3] BARBIERI, R.L., LEE, H. and RYAN, K.J. *Fertil. Steril.* (1979) 31: 182-186.
[4] BARBOSA, J., SEAL, U.S. and DOE, R.P. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33: 388-398.
[5] BOADA, L.D., FERNÁNDEZ, L., ZUMBADO, M., LUZARDO, O.P., CHIRINO, R. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1450-1458.
[6] CHIRINO, R., LÓPEZ, A., NAVARRO, D., CABRERA, J.J., RIVERO, J.F. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1989) *J. Steroid Biochem.* 34: 97-105.
[7] CHIRINO, R., FERNÁNDEZ, L., LÓPEZ, A., NAVARRO, D., RIVERO, J.F., DÍAZ-CHICO, J.C. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1991) *Endocrinology* 129: 3118-3124.
[8] CHIRINO, R., FERNÁNDEZ, L., LÓPEZ, A., NAVARRO, D., RIVERO, J.F., DÍAZ-CHICO, J.C. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1992) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41: 757-760.
[9] CHIRINO, R., LÓPEZ, A., FERNÁNDEZ, L., BOADA, L.D., VALERÓN, P.F., DÍAZ-CHICO, J.C. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1994) *Endocrinology* 134: 1409-1415.
[10] DANIEL, F., GOPAL RAO, D. and TYRRELL, C.J. (1991) *Cancer* 67: 2966-2968.
[11] EISENFELD, A.J. and ATEN, R.F. (1987) *J. Steroid Biochem.* 27: 1109-1118.
[12] FERNÁNDEZ, L., CHIRINO, R., BOADA, L.D., NAVARRO, D., CABRERA, N., DEL RÍO, I. and DÍAZ-CHICO, B.N. (1994a) *Endocrinology* 134: 1401-1408.
[13] FERNÁNDEZ, L., BOADA, L.D., LUZARDO, O.P., ZUMBADO, M., DÍAZ-CHICO, J.C., DÍAZ-CHICO, B.N. and CHIRINO, R. (1994b) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 1121-1126.

[14] FERNÁNDEZ, L., BOADA, L.D., LUZARDO, O.P., ZUMBADO, M., LÓPEZ, A., DÍAZ-CHICO, B.N. and CHIRINO, R. (1995) *Pharmacol. & Toxicol.* 77: 264-269.
[15] GRALNICK, H.R. and RICK, M.E. (1983) *N. Engl. J. Med.* 308: 1393-1395.
[16] HOWELL, G.M., GUSTAFSSON, J.A. and LEFEBVRE, Y.A. (1990) *Endocrinology* 127: 1087-1096.
[17] KAUFMANN, S.H. and SHAPER, J.H. (1984) *J. Steroid Biochem.* 20: 699-708.
[18] LACASSE, E., HOWELL, G.M. and LEFEBVRE, Y.A. (1990) *J. Steroid Biochem.* 35: 47-54.
[19] LAURELL, C.B. and RANNEVIK, A. (1979) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 719-725.
[20] LÓPEZ-GUERRA, A., CHIRINO, R., BOADA, L.D., ZUMBADO, M., LUZARDO, O.P., NAVARRO, D., FERNÁNDEZ L. and DIAZ-CHICO, B.N. *J. Endocrinol.* (Enviado)
[21] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
[22] LUKAS, S.E. (1993) *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 61-68.
[23] MAYER, M. and ROSEN, F. (1975) *Am. J. Physiol.* 229: 1381-1386.
[24] MAYEWSKI, R.J. and LITWACK, G. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 729-735.
[25] MCPHERSON, G.A. (1985) *J. Pharmacol. Method.* 14: 213-228.
[26] NEET, K.E. (1980) *Methods Enzymol.* 64: 139-192.
[27] NOTIDES, A.C., LERNER, N. and HAMILTON, D.E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 78: 4926-4930.
[28] OMRANI, G.R., FURUKAWA, H., SHERWOOD, J.A. and LOEB, J.N. (1983) *Endocrinology* 112: 178-186.
[29] PARCHMAN, L.G., CAKE, M.H. and LITWACK, G. (1978) *Mech. Ageing Dev.* 7: 227-240.
[30] QUELLE, F.W., SMITH, R.V., HRYCYNA, C.A., KALIBAN, T.D., CROOKS, J.A. and OBRIEN, J.N. (1988) *Endocrinology* 123: 1642-1651.
[31] RAMAMOORTHY, J.D., RAMAMOORTHY, S., MAHESH, V.B., LEIBACH, F.H. and GANAPATHY, V. (1995) *Endocrinology* 136: 924-932.
[32] ROSZAK, A.W., LEFEBVRE, Y.A., HOWELL, G.M. and CODDING, P.W. (1990) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37: 201-214.
[33] ROY, A.K., MILIN, B.S. and MCMINN, A.M. (1974) *Biochem. Biophys. Acta* 354: 213-232.
[34] SHEFFER, A.L., FEARON, D.T. and AUSTEN, K.F. (1981) *J. Allergy Clin. Immunol.* 68: 181-187.
[35] STEINSAPIR, J., BRYHAN, M. and MULDOON, T.M. (1989) *Endocrinology* 125: 2297-2311.
[36] VALERÓN, P.F., CHIRINO, R., FERNÁNDEZ, L., TORRES, S., NAVARRO, D., AGUIAR, J., CABRERA, J.J., DÍAZ-CHICO, B.N. and DÍAZ CHICO, J.C. (1996) *Int. J. Cancer* 65: 129-133.
[37] VALERÓN, P.F., CHIRINO, R., VEGA,V., FALCÓN, O., RIVERO, J.F., TORRES, S., LEÓN, L., FERNÁNDEZ, L., PESTANO, J., DÍAZ-CHICO, B.N. and DÍAZ CHICO, J.C. *Int. J.Cancer* (aceptado para su publicación, 1997)
[38] WILSON, J.D. (1988) *Endocr. Rev.* 9: 181-199.
[39] YAMADA, M., INDO, K., NISHIGAMI, T. and NAKASHO MIYAJI, H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 11035-11043.
[40] YAMADA, M., NISHIGAMI, T., NAKASHO, K., NISHIMOTO, Y. and MIYAJI, H. (1994) *Hepatology* 20: 1271-1280.